

唐跃辉,包欣欣,王 健,等. 小桐子 *Dof* 基因家族生物信息学与表达分析[J].江苏农业学报,2019,35(1):15-25.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2019.01.003

小桐子 *Dof* 基因家族生物信息学与表达分析

唐跃辉¹, 包欣欣², 王 健¹, 冯荆城³, 张 梦³, 张慧聪³, 刘梦兰³, 王玉瑾²,
娄慧敏³, 闫 浩³, 谭 结³, 王清伟³, 刘 坤¹

(1.周口师范学院植物遗传与分子育种重点实验室,河南 周口 466001; 2.周口师范学院新闻与传媒学院,河南 周口 466001;
3.周口师范学院生命科学与农学学院,河南 周口 466001)

摘要: *Dof* 转录因子在植物的生长发育和非生物胁迫响应中起重要的调控作用。在本研究中,总共 24 个小桐子 *Dof* 基因被鉴定。保守域分析结果表明,小桐子 *Dof* 蛋白的结构域均含有 CX₂CX₂₁CX₂C 基序。染色体定位分析结果表明,23 个 *Dof* 基因不均匀地分布在 9 个连锁群(LGs)上。系统发育树表明,24 个小桐子 *Dof* 蛋白被分成 9 个组。在这 24 个 *Dof* 基因中,大多数在被检测的组织中显示出差异表达;14 个 *Dof* 基因的表达在至少 1 个胁迫(干旱或盐胁迫)条件下显示出增加或者降低。在这 14 个差异表达 *Dof* 基因中,8 个 *Dof* 基因(*JcDof4*、*JcDof8*、*Jcdof9*、*Jcdof10*、*Jcdof11*、*Jcdof21* *Jcdof22*、*Jcdof24*)至少在 1 个处理时间点表现出对干旱和盐胁迫响应,2 个基因(*JcDof2*、*JcDof23*)仅对盐胁迫响应,4 个基因(*JcDof3*、*JcDof5*、*JcDof17*、*JcDof20*)仅对干旱胁迫响应。该结果将为进一步研究 *Dof* 基因在调控小桐子生长发育和非生物胁迫响应中的作用提供一些有价值的信息。

关键词: 小桐子; *Dof* 基因; 转录因子; 表达模式

中图分类号: S794.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)01-0015-11

Bioinformatics and expression analysis of the *Dof* gene family in physic nut

TANG Yue-hui¹, BAO Xin-xin², WANG Jian¹, FENG Jing-cheng³, ZHANG Meng³, ZHANG Hui-cong³,
LIU Meng-lan³, WANG Yu-jin², LOU Hui-min³, YAN Hao³, TAN Jie³, WANG Qing-wei³, LIU Kun¹

(1.Key Laboratory of Plant Genetics and Molecular Breeding, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China; 2.School of Journalism and Communication, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China; 3.College of Life Science and Agronomy, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China)

Abstract: The *Dof* transcription factors play an important regulatory role in plant growth and development and abiotic stress response. In this study, a total of 24 *Dof* genes were identified in the physic nut. The results of conserved domain analysis showed that physic nut *Dof* proteins contained CX₂CX₂₁CX₂C motif. Chromosomal location analysis results suggested that 23 *Dof* genes were unevenly distributed on nine linkage groups (LGs) of physic nut. Phylogenetic analysis results

suggested that the 24 physic nut *Dof* proteins were clustered into nine groups. Most of these 24 *Dof* genes showed differential expression in these tested tissues. The expression of 14 *Dof* genes increased or decreased under at least one stress (drought or salt stress). Out of these 14 differentially expressed genes, eight *Dof* genes (*JcDof4*, *JcDof8*, *Jcdof9*, *Jcdof10*, *Jcdof11*, *Jcdof21* *Jcdof22*, *Jcdof24*) showed the differential response to both drought

收稿日期:2018-05-22

基金项目:河南省科学技术厅科技攻关项目(182102110200);2018年度河南省高等学校重点科研项目(18A180035);周口师范学院高层次引进人才科研基金启动项目(ZKNUC2016030、ZKNUC2015121)

作者简介:唐跃辉(1985-),男,河南许昌人,博士,讲师,主要从事小桐子和水稻基因功能研究。(Tel)0376-8178586;(E-mail)yhtang2005@163.com。包欣欣与王健为共同第一作者。

and salt stress at least one time point, two *Dof* genes (*JcDof2*, *JcDof23*) only responded to salt stress, and four *Dof* genes (*JcDof3*, *JcDof5*, *JcDof17*, *JcDof20*) only responded to drought stress. The results will provide some valuable information for further studies on the roles of *Dof* genes in regulating physic nut's growth, development and responses to abiotic stress.

Key words: physic nut (*Jatropha curcas* L.); *Dof* gene; transcription factor; expression pattern

土壤干旱、盐碱已成为制约中国农作物生长发育的瓶颈^[1-5],直接关系到中国的国家安全和国民经济可持续发展,解决这一问题的途径就是大力加强耐逆性相关基因的挖掘及在分子育种中的开发利用研究^[6]。其中,分子育种以其年限短、效率高和目的性强等特点受到作物育种学家的高度青睐,是未来作物育种的主要手段。小桐子,又名小油桐、麻疯树(*Jatropha curcas* L.),是大戟科麻疯树属的多年生落叶灌木/小乔木,具有耐土壤瘠薄、耐盐特别是耐干旱的特性。因此从具有耐受干旱、贫瘠、盐等特性的小桐子中挖掘耐干旱、耐盐等高效利用的基因资源,并申请基因专利保护,对农作物耐逆品种培育具有重要的农业价值和应用意义。

Dof 蛋白是植物特有的一类转录因子,其名称源于靠近 N 末端的一段由 50 个氨基酸组成的高度保守的 C₂C₂ 锌指 DNA 结构域(命名为 *Dof* 结构域),该结构域通过结合下游靶基因启动子区 T/AAAAG 基序,直接激活这些基因的表达,在植物的生长发育、生物及非生物胁迫响应中起重要的调控作用^[7-10]。相反,*Dof* 蛋白的 C 末端是非常多变的,该区域包含蛋白质-蛋白质相互作用域和调控基序^[7-8],如位于拟南芥 *AtDOF4.2* 和 *AtDOF4.4* 蛋白 C 末端的 Thr-Met-Asp 基序,该基序主要负责 *AtDOF4.2* 和 *AtDOF4.4* 蛋白的转录激活能力^[11]。根据 *Dof* 蛋白全长氨基酸序列的相似性和拓扑结构特征,拟南芥 *Dof* 基因家族成员被分成 9 个组,即 A、B1、B2、C1、C2.1、C2.2、C3、D1 和 D2^[12]。近年来,研究者们对植物尤其是拟南芥和番茄的研究结果表明,*Dof* 转录因子对植物的生长发育、初生和次生物质代谢、种子成熟和萌发、抗逆性、植物激素信号转导等有重要的调控作用^[13],如番茄 *Dof* 转录因子 *SICDF1* 和 *SICDF3* 通过直接激活胁迫响应基因 *COR15*、*RD29A*、*RD10* 的表达,增加了转基因拟南芥对干旱和盐胁迫的抗性^[14];拟南芥 *Dof* 家族基因 *CDF3* 是一个正调控因子,过表达 *CDF3* 基因推迟了拟南芥的开花时间,增加了拟南芥对干旱和冷胁迫的抗性^[15];ChIP 分析显示,*AtDOF5.4/OBP4* 通过直接抑

制下游基因 *CyclinB1;1*、*CDKB1;1* 和 *XTH* 的表达,负调控细胞周期进程和细胞生长^[16]; *AtDOF4.2* 通过直接激活细胞壁松弛因子 *AtEXPA9* 的表达,正调控种子表皮的发育^[11]。这些研究结果表明,*Dof* 转录因子主要通过调控下游基因的表达,从而影响植物的生长发育进程。目前,随着全基因组学和转录组学测序技术的发展,许多物种 *Dof* 转录因子已经被鉴定和全基因组分析,如拟南芥^[12]、水稻^[12]、大白菜^[17]、辣椒^[8]、番茄^[18]等。值得注意的是,关于 *Dof* 蛋白的克隆和功能研究主要集中在拟南芥、番茄、水稻等模式植物中^[13-16],然而,在大戟科物种中尤其在小桐子中鲜有报道。

目前,对大戟科物种 *Dof* 家族基因的组织特异性及非生物胁迫条件下的表达模式和功能的研究尚未见报道,因此,进行小桐子 *Dof* 转录因子家族成员的鉴定、表达模式和全基因组详细分析尤为必要,且亟需进行。基于小桐子全基因组测序和不同条件下的表达谱分析结果,筛选并鉴定出小桐子 *Dof* 基因家族成员,利用生物信息学和转录组学技术,全面分析了小桐子 *Dof* 家族成员的保守域、系统发育树、保守基序、染色体定位,组织特异性表达及非生物胁迫条件下表达模式。该研究结果为进一步研究 *Dof* 基因在小桐子生长发育和非生物胁迫响应中的潜在功能提供良好的理论基础和依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料与胁迫处理

小桐子种子来源于中国贵州省,并种植于中国广东省广州市中国科学院华南植物园实验基地。小桐子干旱、盐胁迫处理方法参考 Tang 等^[19]进行,胁迫处理后,选取根进行转录组测序及 qRT-PCR 分析^[20-21],并选取正常生长条件下的根、茎、叶和授粉后 14 d 和 35 d 的种子用于组织特异性表达分析^[19,22],锡箔纸包裹后立即放入 -80 °C 超低温冰箱保存待用。

1.2 RNA 提取

采用美基生物 (Magen, <http://www.magentec.com>)

com.cn/)植物 RNA 提取试剂盒(货号 R4152-02)进行小桐子各组织 RNA 提取,具体的操作方法参考试剂盒说明书中难提抽植物组织总 RNA 小量抽提进行。采用 TaKaRa 公司(<http://www.takarabiomed.com.cn/>)逆转录试剂盒(货号 6210A)进行第一链 cDNA 合成,具体操作方法参考试剂盒说明书进行。

1.3 小桐子 *Dof* 基因鉴定

采用已经鉴定的拟南芥和水稻 *Dof* 基因家族所有成员作为寻找序列,通过 NCBI 小桐子基因组数据库进行 BLAST 同源序列比对,筛选并鉴定出小桐子 *Dof* 基因。并通过 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 蛋白结构域分析程序对所鉴定出的小桐子 *Dof* 蛋白进行检测和确认。通过 ExPASy 网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)对小桐子 *Dof* 蛋白的理化性质如分子量、等电点、氨基酸的数目进行分析。

1.4 小桐子 *Dof* 蛋白系统发育树、保守域和保守基序分析

拟南芥 *Dof* 家族蛋白从拟南芥信息资源数据库(TAIR,<http://www.arabidopsis.org/>)下载获得,水稻 *Dof* 转录因子来源于 Phytozome 网站(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)。ClustalX 被用来进行 *Dof* 蛋白多序列比对分析^[23]。通过 MEGA5 软

件邻位算法(Neighbor-Joining, NJ)进行拟南芥、水稻和小桐子 *Dof* 蛋白系统发育树的构建(参数如下:bootstrap 复制次数为1 000;空白/缺失数据处理是完全删除)^[24]。通过 DNAMAN6.0 软件对小桐子 *Dof* 蛋白保守域进行分析。通过 MEME 4.12.0 版本(<http://memesuite.org/tools/meme>)对小桐子 *Dof* 蛋白保守基序进行分析(参数如下:基序数目设置为14,基序宽度设置为6~200)。

1.5 小桐子 *Dof* 基因染色体定位分析

根据已经报道的小桐子全基因组测序和连锁图谱结果^[25-26],对小桐子 *Dof* 基因进行染色体精确定位,并通过 MapChart 作图软件进行作图分析。

1.6 小桐子 *Dof* 基因表达谱分析和 qRT-PCR 验证

小桐子 *Dof* 基因表达谱测序和 qRT-PCR 验证的方法参考 Tang 等^[19]的方法进行,根、茎和叶组织特异性数据参考文献[20]和[21],小桐子干旱数据在 NCBI 利用号 PRJNA257901,盐胁迫转录组测序数据在 NCBI 利用号 PRJNA244896,种子不同发育时期(其中种子发育早期是授粉后 15 d,种子发育后期是授粉后 35 d)的表达谱数据来源于 Jiang 等^[22]。引物见表 1。

表 1 定量 PCR 引物

Table 1 Primers used in the qRT-PCR

基因	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
<i>JcDof4</i>	CCCCTGGTGGTCTTGGTG	CTGAGTTGTCTTCTACGCTTG
<i>JcDof10</i>	ATGACCCAACTGAAGCTGCA	CGAGACAAGGCAGCAGGG
<i>JcDof13</i>	GGTTGCTCGTCTCCATCATC	TAAAGCCTCATTTGGGTATC
<i>JcDof20</i>	TGGACAACACTTGGGATTAATAAG	ACAAGGCAGCAGGATTGGC
<i>JcDof21</i>	CCTCAACCGTCTTCTCCAAA	GCTTCTCCAGGGTCATCAAT
<i>JcAction (JQ806331)</i>	TAATGGTCCCTCTGGATGTG	AGAAAAGAAAAGAAAAAGCAGC

2 结果与分析

2.1 小桐子 *Dof* 基因的鉴定

利用已经鉴定的拟南芥和水稻 *Dof* 基因家族所有成员,通过 NCBI 小桐子基因组数据库进行 BLAST 比对寻找,共鉴定出 24 个小桐子 *Dof* 转录因子。为了更好地区分小桐子 *Dof* 转录因子,基于 *Dof* 基因在染色体上的定位(从上到下),小桐子

Dof 基因被暂时命名为 *JcDof1* ~ *JcDof24*。通过 ExPASy 网站对 *Dof* 蛋白的理化性质进行分析,结果表明,*Dof* 基因开放阅读框的长度从 483 bp (*JcDof4*, NCBI 基因 ID 为 JCGZ_21565) 到 1 569 bp (*JcDof16*, NCBI 基因 ID 为 JCGZ_12318),对应的编码氨基酸的长度从 160 至 525,蛋白质分子量的大小从 18 200 至 56 500(表 2)。此外,通过 DNAMAN5.0 软件进一步对 24 个小桐子 *Dof* 蛋白的结

构域进行分析,结果表明,小桐子 Dof 蛋白的结构域是高度保守的,且所有 Dof 蛋白的结构域均含有 $CX_2CX_{21}CX_2C$ 基序,进而构成 C_2-C_2 单锌指结构

(图 1),该结果进一步证明了我们所鉴定的蛋白为 Dof 家族的成员。

表 2 小桐子 Dof 基因

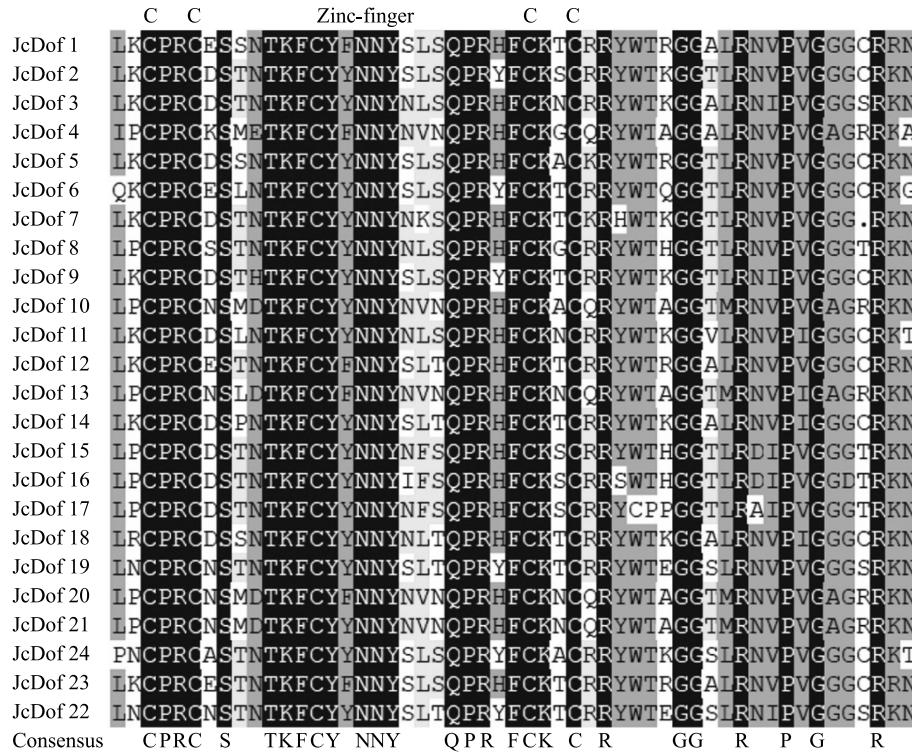
Table 2 Dof genes in physic nut

基因	基因号	染色体	组别	ORF 长度 (bp)	编码的蛋白质		
					大小(nt)	等电点	分子量($\times 10^3$)
<i>JcDof1</i>	JCGZ_05689	LG2	B1	1 260	315	9.23	33.9
<i>JcDof2</i>	JCGZ_05589	LG2	C1	873	290	6.65	32.4
<i>JcDof3</i>	JCGZ_24801	LG2	A	750	249	8.26	26.5
<i>JcDof4</i>	JCGZ_21565	LG3	D1	483	160	9.40	18.2
<i>JcDof5</i>	JCGZ_21459	LG3	B2	1 098	365	8.72	40.0
<i>JcDof6</i>	JCGZ_21458	LG3	C1	966	321	9.42	34.9
<i>JcDof7</i>	JCGZ_21405	LG3	B2	852	283	8.87	31.2
<i>JcDof8</i>	JCGZ_04337	LG4	D2	738	245	8.52	25.9
<i>JcDof9</i>	JCGZ_11472	LG5	C1	939	312	6.75	35.0
<i>JcDof10</i>	JCGZ_11638	LG5	D1	1 416	471	6.61	51.5
<i>JcDof11</i>	JCGZ_11766	LG5	A	1 005	334	6.86	36.5
<i>JcDof12</i>	JCGZ_09056	LG6	B1	1 062	353	9.14	36.6
<i>JcDof13</i>	JCGZ_02656	LG6	D1	1 494	497	7.78	53.6
<i>JcDof14</i>	JCGZ_18734	LG7	B2	1 029	343	8.97	36.7
<i>JcDof15</i>	JCGZ_12319	LG7	D2	645	214	7.65	21.6
<i>JcDof16</i>	JCGZ_12318	LG7	D2	1 569	525	8.49	56.5
<i>JcDof17</i>	JCGZ_12316	LG7	D2	741	246	8.72	25.1
<i>JcDof18</i>	JCGZ_12335	LG7	E	981	326	9.08	34.9
<i>JcDof19</i>	JCGZ_14231	LG8	C2.1	864	287	8.87	31.3
<i>JcDof20</i>	JCGZ_15619	LG8	D1	1 398	465	6.80	51.1
<i>JcDof21</i>	JCGZ_19859	LG9	D1	1 557	518	5.88	55.7
<i>JcDof22</i>	JCGZ_20398	LG9	C2.1	909	302	8.69	32.8
<i>JcDof23</i>	JCGZ_01467	LG10	B1	1 017	338	9.19	35.7
<i>JcDof24</i>	JCGZ_25217	无	C2.2	864	287	4.65	32.8

2.2 小桐子、水稻、拟南芥 Dof 家族蛋白系统发育树

为了研究小桐子 Dof 蛋白与已经鉴定的拟南芥和水稻 Dof 蛋白之间的系统发育关系,基于小桐子、拟南芥和水稻 Dof 蛋白全长氨基酸序列相似性和拓扑结构特征,一个无根 NJ 系统发育树被构建(图 2)。依据 Lijavetzky 等^[6]对拟南芥 Dof 蛋白的分类方法,系统发育树将 23 个小桐子 Dof 蛋白、22 个水稻 Dof 蛋白、36 个拟南芥 Dof 蛋白分为 9 个组,即 A, B1, B2,

C1, C2.1, C2.2, C3, D1 和 D2(图 2)。其中,在这 81 个 Dof 蛋白中,7 个 Dof 蛋白被分到 A 组(包含 2 个小桐子 Dof 蛋白),12 个 Dof 蛋白被分到 B1 组(包含 3 个小桐子 Dof 蛋白),7 个 Dof 蛋白被分到 B2 组(包含 3 个小桐子 Dof 蛋白),8 个 Dof 蛋白被分到 C 组(包含 3 个小桐子 Dof 蛋白),9 个 Dof 蛋白被分到 C2.1 组(包含 2 个小桐子 Dof 蛋白),5 个 Dof 蛋白被分到 C2.2 组(包含 1 个小桐子 Dof 蛋白),5 个 Dof 蛋白被分到 C3 组(包含 0 个小桐子 Dof 蛋白),17 个 Dof 蛋

图1 小桐子 *Dof* 蛋白 *Dof* 保守结构域分析Fig.1 Analysis of the *Dof* conserved domain in physic nut *Dof* proteins

白被分到 D1 组(包含 5 个小桐子 *Dof* 蛋白), 11 个 *Dof* 蛋白被分到 D2 组(包含 4 个小桐子 *Dof* 蛋白)。此外, 系统发育树显示, 8 个水稻 *Dof* 蛋白和 1 个小桐子 *Dof* 蛋白(JcDof18) 形成了一个独立的分支, 该独立的分支被命名为 E 组(图 2)。

2.3 小桐子 *Dof* 蛋白保守基序

通过 MEME 对小桐子 *Dof* 蛋白保守基序进行了详细的分析。结果表明, 14 个独立的保守基序被鉴定, 命名为基序 1~14, 其中基序 1 为 C₂-C₂ 单锌指结构, 存在于所有的小桐子 *Dof* 蛋白中(图 3)。正如已经报道的拟南芥、水稻、胡椒和菊花相同组的 *Dof* 蛋白的保守基序一样^[8,12,17], 小桐子同一组的 *Dof* 蛋白保守基序的氨基酸序列也是高度保守的(图 3), 该结果进一步支持了系统发育树中小桐子 *Dof* 蛋白的分组。该结果也表明, 在相同组中含有相同保守基序的 *Dof* 蛋白也许具有相似的功能。但是, 由于这些基序在 SMART 和 Pfam 保守基序数据库缺少同源性序列, 所以大多数 *Dof* 蛋白保守基序的功能是未知的, 具体的功能还需要进一步的检测。

2.4 小桐子 *Dof* 基因染色体定位

基于小桐子全基因组测序和连锁图分析结果^[25], 小桐子 23 个 *Dof* 基因不均匀地分布在不同的染色体上(JcDof24 除外), 然而没有 *Dof* 基因定位于 1 号染色体(LG1) 和 11 号染色体(LG11)(图 4)。在剩下的 9 个连锁图(linkage groups, LG) 中, 3 个小桐子 *Dof* 基因分布于 LG2, 4 个小桐子 *Dof* 基因分布于 LG3, 1 个小桐子 *Dof* 基因分布于 LG4, 3 个小桐子 *Dof* 基因分布于 LG5, 2 个小桐子 *Dof* 基因分布于 LG6, 5 个小桐子 *Dof* 基因分布于 LG7, 2 个小桐子 *Dof* 基因分布于 LG8, 2 个小桐子 *Dof* 基因分布于 LG9, 1 个小桐子 *Dof* 基因分布于 LG10。此外, 连锁图显示, 大部分小桐子 *Dof* 基因分布于连锁图的中部和下部区域(图 4)。Cannon 等^[26] 把串联重复定义为重复序列之间的距离小于 50 kb 或者被 3 个异源基因隔离开, 该序列的重复就称为串联重复(Tandem duplicates, T)。小桐子 *Dof* 基因连锁图分析结果表明, 小桐子 *Dof* 转录因子也存在串联重复, 即 T1 (JcDof5 和 JcDof6), T2 (JcDof10 和 JcDof11), T3 (JcDof15 和 JcDof16)(图 4)。

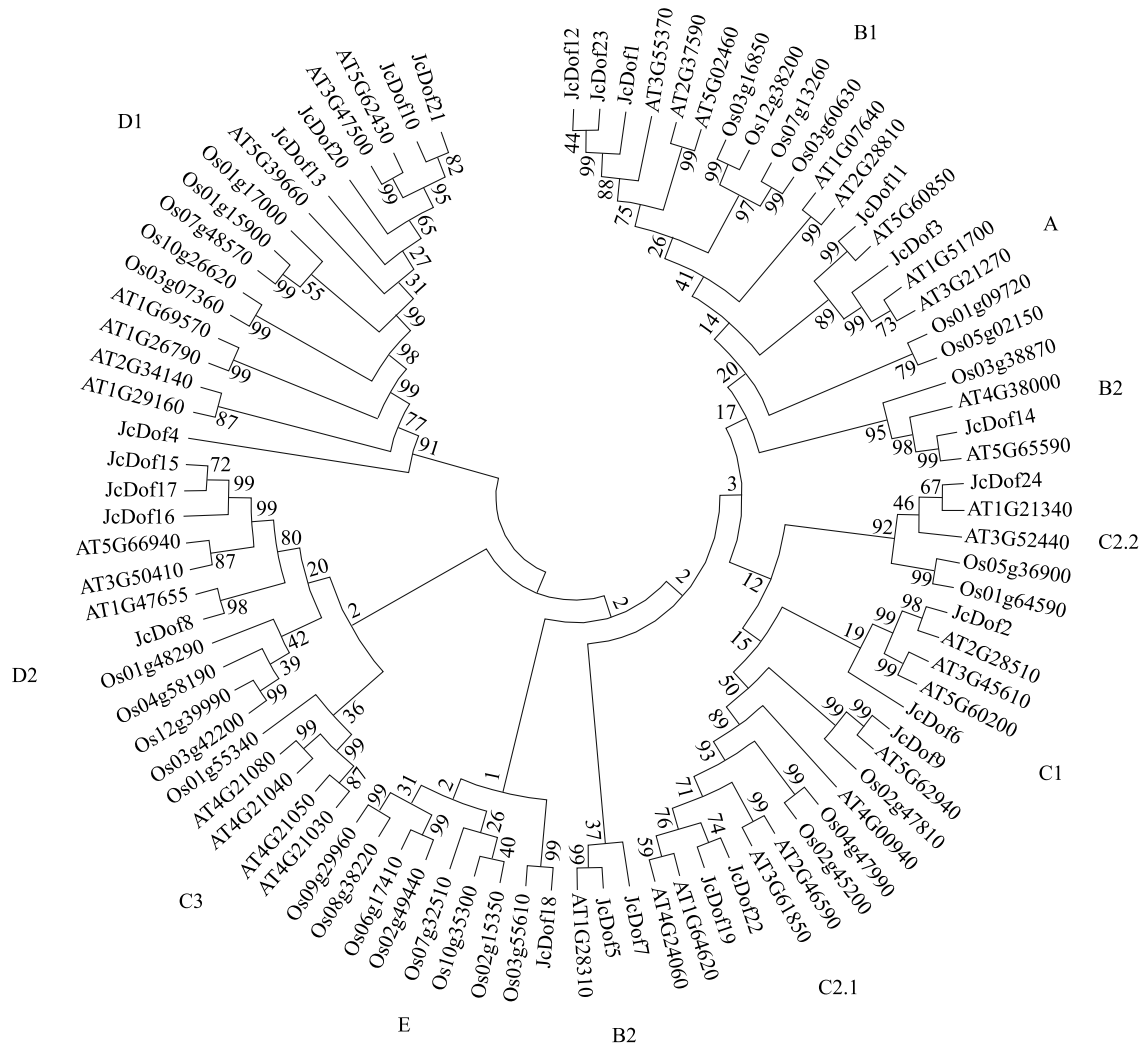


图2 拟南芥、水稻和小桐子 Dof 蛋白系统发育树分析

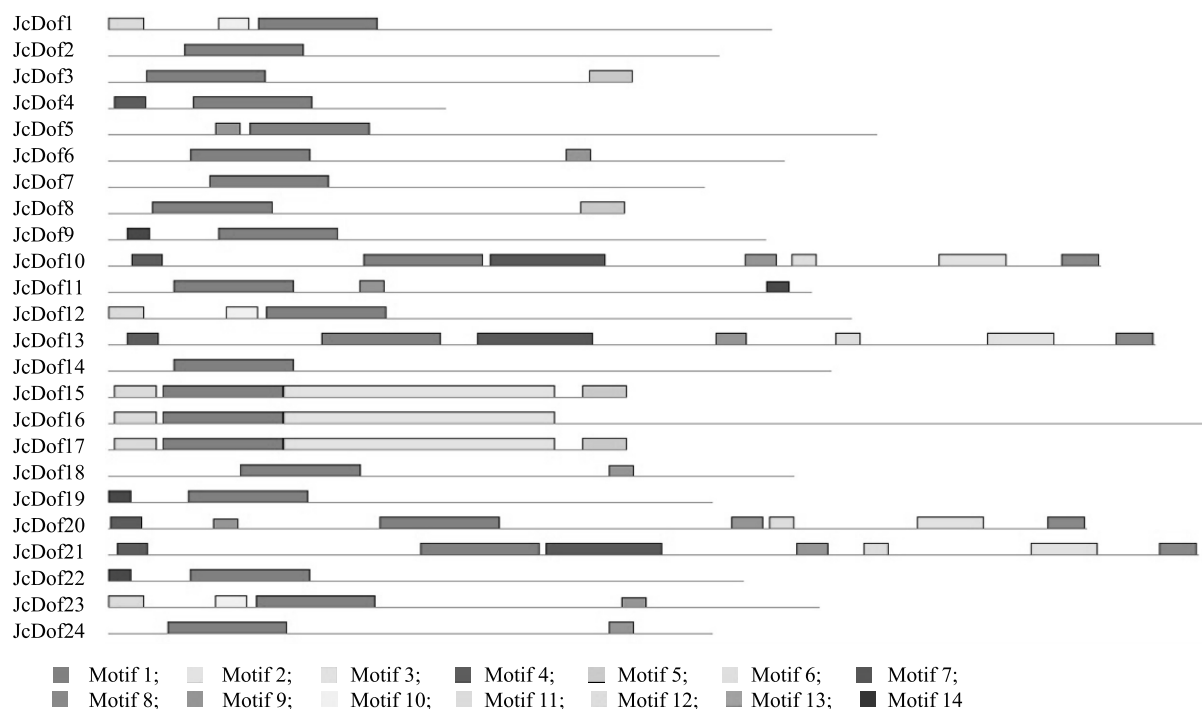
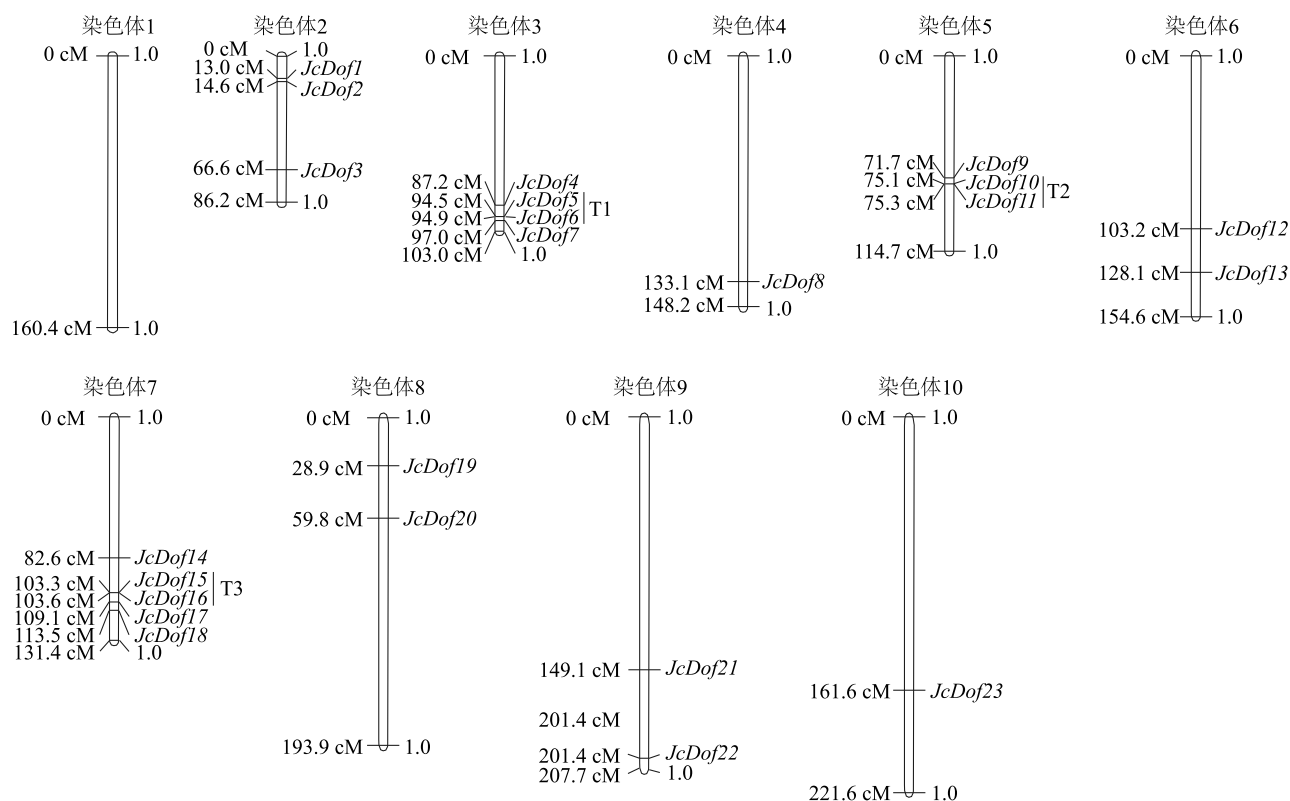
Fig.2 Analysis of the phylogenetic tree of Arabidopsis, rice and physic nut Dof proteins

2.5 小桐子 Dof 基因组织特异性表达

为了更好地研究 Dof 基因在小桐子生长发育中的作用,基于小桐子各组织表达谱数据^[19-22],我们分析了小桐子 Dof 基因在根、茎皮层、叶、种子中的表达模式(图 5)。结果表明, Dof15 和 Dof16 基因在所有被检测的组织中都没有检测到表达, Dof14 基因在根中没有检测到表达, Dof12 基因在根、叶中没有检测到表达, Dof18 在叶中没有检测到表达。此外,在这 24 个基因中,3 个 Dof 基因(JcDof4、JcDof8、JcDof19)在根中表达最高,1 个 Dof 基因(JcDof7)在茎皮层中表达最高,5 个 Dof 基因(JcDof2、JcDof3、JcDof9、JcDof13、JcDof14)在种子中表达最高,11 个 Dof 基因(JcDof1、

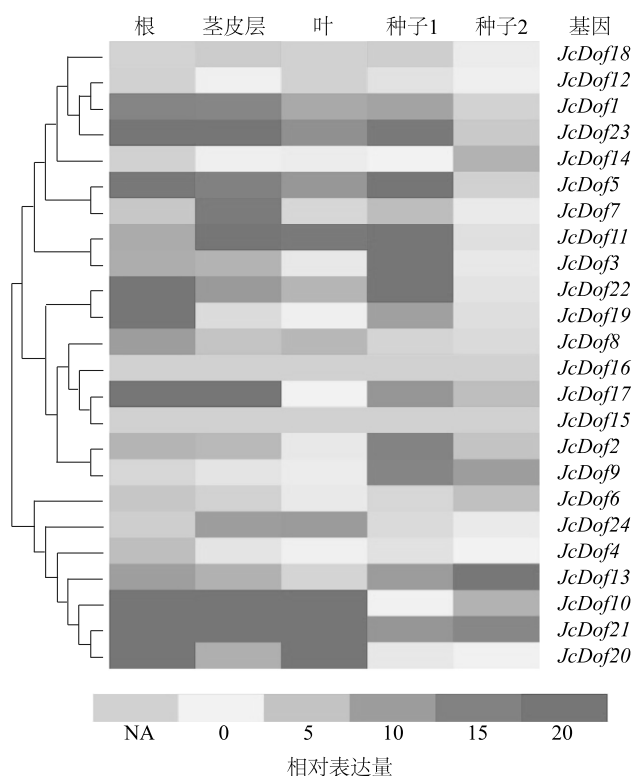
JcDof5、JcDof6、JcDof10、JcDof11、JcDof17、JcDof20、JcDof21、JcDof22、JcDof23、JcDof24)在被检测的各组织中显示组成型表达。

前人研究结果表明, Dof 基因在种子的萌发和成熟过程中起关键的调控作用^[11-13]。为了初步探索 Dof 基因在小桐子种子发育中的功能,基于小桐子种子不同发育时期表达谱数据^[19,22],我们进一步检测了 Dof 基因在种子不同发育时期的表达模式(图 5),6 个基因(JcDof3、JcDof5、JcDof11、JcDof19、JcDof22、JcDof23)在种子发育早期(种子 1)的表达显著高于在种子发育后期的表达(种子 2),然而,2 个基因(JcDof10、JcDof14)在种子 2 中的表达显著高于在种子 1 中的表达。

图3 小桐子 *Dof* 蛋白保守基序分析Fig.3 Analysis of the conserved motifs of *Dof* proteins in physic nut

T1、T2、T3: 串联重复。

图4 *Dof* 基因在小桐子染色体上的定位Fig.4 Location of *Dof* genes on physic nut chromosomes



种子 1: 种子发育早期; 种子 2: 种子发育后期。

图 5 小桐子 *Dof* 基因在不同组织中的表达模式分析

Fig.5 Expression pattern analysis of physic nut *Dof* genes in different tissues

2.6 小桐子 *Dof* 基因非生物胁迫表达

近几年,越来越多的研究表明,*Dof* 转录因子参与植物对非生物胁迫如干旱、盐胁迫等响应的调控^[13-15]。基于小桐子非生物胁迫下的表达谱数据^[20-21],我们进一步分析了小桐子 *Dof* 基因在干旱胁迫 2 d、4 d、7 d 和盐胁迫 2 h、2 d、4 d 的根中的表达模式(图 6)。结果表明,在干旱或盐胁迫下,14 个小桐子 *Dof* 基因的表达显示出增加或者降低。在这 14 个差异表达的小桐子 *Dof* 基因中,8 个 *Dof* 基因(*JcDof4*、*JcDof8*、*JcDof9*、*JcDof10*、*JcDof11*、*JcDof21*、*JcDof22*、*JcDof24*)在至少一个处理时间点表现出对干旱和盐胁迫响应,2 个基因(*JcDof2*、*JcDof23*)仅仅对盐胁迫响应,4 个基因(*JcDof3*、*JcDof5*、*JcDof17*、*JcDof20*)仅仅对干旱胁迫响应。

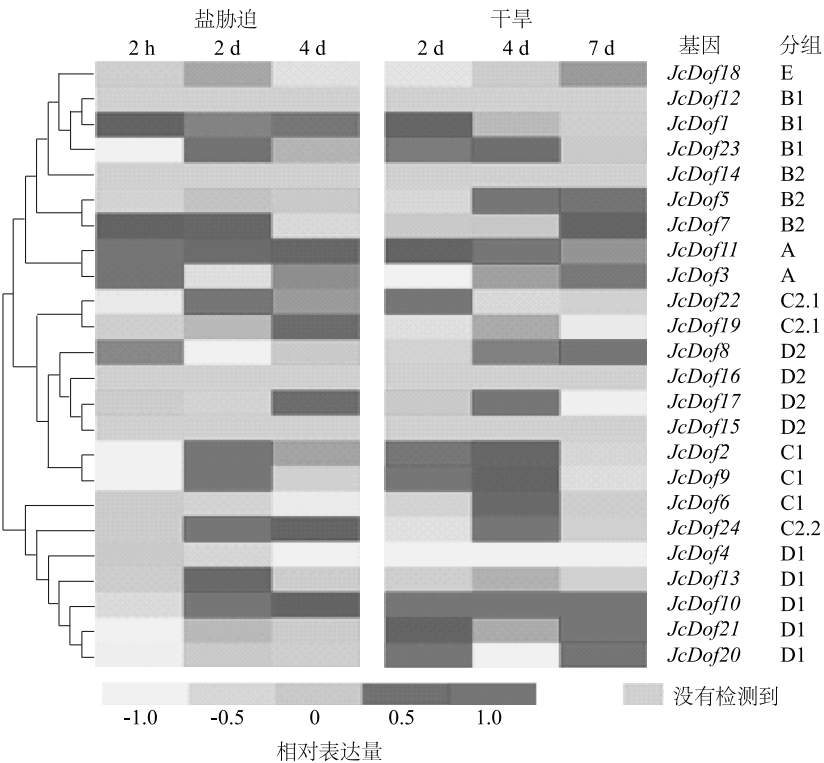
为了证明从表达谱数据获得的小桐子 *Dof* 基因表达模式的可靠性,我们进一步挑选了组 D1 的 5 个 *Dof* 基因(*JcDof4*、*JcDof10*、*JcDof13*、*JcDof20*、*JcDof21*),并通过 qRT-PCR 技术对这 5 个基因在干旱、盐胁迫条件下在根中的表达模式进行验证(图 7)。结果表明,通过 qRT-PCR 技术获得的 *Dof* 基因的表达情况或者胁迫条

件下的变化趋势与表达谱数据相一致。这些结果进一步说明通过转录组测序所获得的小桐子 *Dof* 基因在不同条件下的表达模式是可靠实用的。

3 讨论

Dof 转录因子家族基因在植物的生长、发育和非生物胁迫响应中起重要的调控作用^[9-16]。目前,关于 *Dof* 基因克隆及功能的研究主要集中在模式植物中,如拟南芥、番茄等^[13-16],然而,在非模式植物如小桐子中罕见报道。本研究基于转录组测序数据,首次对小桐子 *Dof* 基因的组织特异性和非生物胁迫条件下的表达模式进行了全面详细的分析,总共 24 个小桐子 *Dof* 蛋白被鉴定。与拟南芥(36 个 *Dof* 蛋白)和水稻(30 个 *Dof* 蛋白)相比^[12],小桐子包含更少的 *Dof* 蛋白,一个可能的解释是小桐子 *Dof* 家族基因没有经历大规模的全基因组倍增事件^[25],然而大规模倍增事件导致拟南芥和水稻 *Dof* 家族基因的扩大^[12,26]。

大量的研究表明,系统发育树能够为不同植物同源基因功能的预测提供一些有价值的信息和依据,如拟南芥、小桐子和水稻 *ERF* 或 *WRKY* 基因



基于转录组数据,lg2 基值 (TPM,胁迫处理信号值/对照信号值) 被用来绘制热点图。

图 6 小桐子 *Dof* 基因在干旱和盐胁迫条件下在根中的表达模式分析

Fig.6 Expression pattern analysis of physic nut *Dof* genes in roots under drought and salt stresses

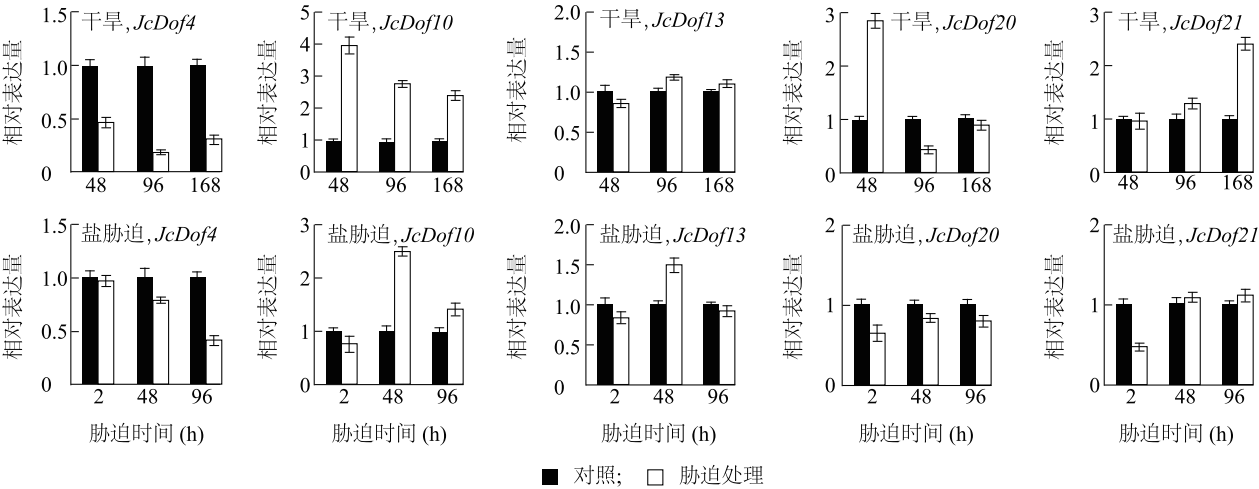


图 7 qRT-PCR 分析

Fig.7 qRT-PCR analysis of the *Dof* genes

家族系统发育树分析结果表明,位于相同亚组的同源基因在保守基序、表达模式和功能等方面是相对保守的^[19,27];小桐子 *JcERF034* (*JcDREB*) 和它在拟南芥中的同源基因 *RAP2.4* (*AT1G78080*) 属于 A6 亚组^[13],*JcERF034* 和 *RAP2.4* 都受干旱胁迫诱导表达,并且在拟南芥中过表达 *JcERF034* 或者 *RAP2.4*

均增加了转基因植物对非生物胁迫的抗性^[28-29]。因此,我们构建了小桐子、拟南芥和水稻 *Dof* 蛋白的系统发育树,该结果不仅可以表明拟南芥、小桐子和水稻 *Dof* 家族蛋白之间的演化关系,而且基于已经鉴定的拟南芥 *Dof* 基因的功能,还可以为小桐子中同源 *Dof* 基因功能的预测提供依据。*AtDOF5.4*/

OBP4 (AT5G60850) 和小桐子 *JcDof11* 位于 A 组的同一个分支, *AtDof5.4/OBP4* 负调控拟南芥细胞周期进程和细胞生长^[10], 这些结果表明, *JcDof11* 基因也许参与小桐子细胞周期进程和细胞生长的调控。 *ATDof5.8* (AT5G66940)、*JcDof8* 和 *JcDof17* 都属于 D2 组的成员且位于系统发育树同一分支, *ATDof5.8* 和 *JcDof8* 均响应干旱、盐胁迫反应且过表达 *ATDof5.8* 增加了转基因拟南芥对非生物胁迫的抗性^[30], *JcDof17* 受干旱胁迫诱导表达, 这些分析结果表明, *JcDof8* 和 *JcDof17* 也许在小桐子响应非生物胁迫反应中起重要的调控作用。总之, 系统发育树能够提供一些重要的信息, 为小桐子 *Dof* 基因功能的研究提供有价值的依据。值得注意的是, E 组在系统发育树上形成了一个独立的分支, 且该组包含 8 个水稻 *Dof* 蛋白和 1 个小桐子 *Dof* 蛋白, 不包含拟南芥 *Dof* 蛋白。该结果表明, E 组的 *Dof* 蛋白也许是在水稻、拟南芥、小桐子共同祖先的进化过程中, 在水稻和小桐子中保存了下来或者是在拟南芥中丢失。

近几年, 越来越多的转录因子家族全基因组的研究结果表明, 蛋白序列所含有的保守基序或者功能域在相同的组中是高度保守的, 如 *ERF*、*WRKY* 等转录因子家族^[19,28]。然而这些保守基序和系统发育树一样, 也能够为研究未知基因的功能提供一些有价值的信息^[31]。在本研究中, 大多数在同一组中的小桐子 *Dof* 蛋白拥有相似的保守基序。这些结果表明, 包含相似保守域的这些 *Dof* 蛋白也许在小桐子生长发育中拥有相似的功能, 值得我们进一步研究和开发利用。

通常, 基因的表达模式往往可以为该基因功能的预测提供一些重要的信息。基于小桐子表达谱数据, 我们分析了小桐子 *Dof* 基因在根、茎皮层、叶和种子不同发育时期的表达模式。 *JcDof4* 在根中表达量最高, 其表达模式和它在拟南芥中的同源基因 *CDF4* (AT2G34140) 的表达模式是相似的, 异位表达 *CDF4* 导致根小柱细胞 (Columella cells) 提前分化^[32], 因此, 我们推测 *JcDof4* 可能参与小桐子根生长与发育的调控。 *JcDof13* 在小桐子种子发育后期表达最高, 并且它的同源基因 *AT3G47500* 在种子成熟期上调表达^[12], 因此我们推测 *JcDof13* 在小桐子种子成熟期可能起重要的调控作用。 *JcDof7* 在茎皮层有高的表达, 它的同源基因 *AT1G28310* 目前还没有相关的研究报道, 说明 *JcDof7* 或者 *AT1G28310* 也许在植物茎发育

与形成中起重要的作用, 具体功能还需要进一步验证。 *JcDof14* 在种子不同发育时期的表达量随着种子的成熟逐渐增加, 且该基因在根、茎皮层和叶中几乎检测不到表达, 该结果表明 *JcDof14* 基因参与种子不同发育阶段的调控。 *JcDof14* 在拟南芥中的同源基因 *SCAP1* (AT5G65590) 通过调控气孔成熟相关基因的表达, 正调控保卫细胞 (Guard cell) 的分化^[33]。前人研究结果表明, *Dof* 基因在植物响应非生物胁迫反应中起重要的调控作用^[13-15]。如在拟南芥中过表达番茄 *SICDF1* 基因增加了转基因植物对盐和干旱胁迫的抗性^[14]; 基于转录组数据分析结果表明, 大多数大白菜和辣椒 *Dof* 基因被盐和干旱诱导表达^[8,17]。本研究中, 12 个小桐子 *Dof* 基因响应盐胁迫反应, 10 个小桐子 *Dof* 基因响应干旱胁迫反应。总之, 表达谱分析结果表明, 小桐子 *Dof* 家族大部分基因在小桐子响应非生物胁迫反应中也许起重要的调控作用, 它们的功能还需要进一步通过试验验证。概括起来, 尽管 *Dof* 转录因子全基因组和表达模式分析不能提供小桐子 *Dof* 基因真正的功能, 但是小桐子 *Dof* 基因表达模式、系统发育树和保守基序分析可以为这些基因在植物生长发育和非生物胁迫响应中的研究提供有价值的理论基础和依据。

本研究中, 总共 24 个小桐子 *Dof* 蛋白被鉴定。该研究首次全面详细地分析了小桐子 *Dof* 转录因子家族基因在正常生长条件和非生物胁迫条件下的表达模式。小桐子、水稻和拟南芥 *Dof* 基因系统发育树和不同条件下的表达模式分析结果为进一步研究 *Dof* 基因在小桐子生长发育和非生物胁迫响应中潜在的功能提供有价值的信息, 进而促进 *Dof* 基因在小桐子抗逆分子育种中的应用。

参考文献:

- [1] 何静丹, 文仁来, 田树云, 等. 抽雄期干旱胁迫与复水对不同玉米品种生长及产量的影响[J]. 南方农业学报, 2017, 48(3): 408-415.
- [2] 张凤军, 叶景秀, 师理, 等. 干旱胁迫下不同抗旱水平马铃薯叶片蛋白质组学分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(9): 23-28.
- [3] 曲杰, 程亮, 王素兰, 等. 3 个时期干旱对夏花生株型、农艺性状及荚果产量的影响[J]. 山东农业科学, 2018, 50(3): 41-44.
- [4] 高树涛, 石生伟. 盐胁迫对 5 种抗旱型小麦苗期生理特性的影响[J]. 南方农业学报, 2017, 48(8): 1374-1380.
- [5] 赵会君, 马名立, 代飞燕, 等. 盐胁迫对宁夏水稻不同品种萌发指标和同工酶的影响[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 44-

- 47.
- [6] 张丽丽,徐碧玉,刘菊华,等. *MaASR1* 基因通过乙烯途径提高拟南芥抗旱性的作用机制[J]. 江苏农业学报,2018,34(3): 511-519.
- [7] NOGUERO M, ATIF R M, OCHATT S, et al. The role of the DNA-binding one zinc finger (DOF) transcription factor family in plants [J]. Plant Science, 2013, 209(2):32-45.
- [8] WU Z M, CHENG J W, CUI J J, et al. Genome-wide identification and expression profile of Dof transcription factor gene family in pepper (*capsicum annuum* L.) [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7:164.
- [9] EWAS M, KHAMES E, ZIAF K, et al. The tomato DOF daily fluctuations 1, TDDF1 acts as flowering accelerator and protector against various stresses [J]. Scientific Reports, 2017, 7:1-7.
- [10] KURAI T, WAKAYAMA M, ABIKO T, et al. Introduction of the *ZmDof1* gene into rice enhances carbon and nitrogen assimilation under low-nitrogen conditions [J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(8):826-837.
- [11] ZOU H F, ZHANG Y Q, WEI W, et al. The transcription factor AtDOF4.2 regulates shoot branching and seed coat formation in *Arabidopsis* [J]. Biochemical Journal, 2013, 449(2):373-388.
- [12] LIJAVETZKY D, CARBONERO P, VICENTE C J, et al. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and *Arabidopsis* Dof gene families [J]. BMC Evolutionary Biology, 2003, 3(1):1-17.
- [13] GUPTA S, MALVIYA N, KUSHWAHA H, et al. Insights into structural and functional diversity of Dof (DNA binding with one finger) transcription factor [J]. Planta, 2015, 241(3):549-562.
- [14] CORRALES A R, NEBAUER S G, CARRILLO L, et al. Characterization of tomato cycling Dof factors reveals conserved and new functions in the control of flowering time and abiotic stress responses [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(4):995-1012.
- [15] CORRALES A R, CARRILLO L, LASIERRA P, et al. Multifaceted role of cycling DOF factor 3 (CDF3) in the regulation of flowering time and abiotic stress responses in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell and Environment, 2017, 40(5):748-764.
- [16] XU P P, CHEN H Y, YING L, et al. AtDOF5.4/OBP4, a DOF transcription factor gene that negatively regulates cell cycle progression and cell expansion in *Arabidopsis thaliana* [J]. Scientific Reports, 2016, 6:27705.
- [17] MA J, LI M Y, WANG F, et al. Genome-wide analysis of Dof family transcription factors and their responses to abiotic stresses in Chinese cabbage [J]. BMC Genomics, 2015, 16(1):1-14.
- [18] CAI X, ZHANG Y, ZHANG C, et al. Genome-wide analysis of plant-specific Dof transcription factor family in tomato[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2013, 55(6):552-566.
- [19] TANG Y H, QIN S S, GUO Y L, et al. Genome-wide analysis of the *AP2/ERF* gene family in physic nut and overexpression of the *JcERF011* gene in rice increased its sensitivity to salinity stress [J]. PLoS ONE, 2016, 11(3):e0150879.
- [20] ZHANG C, ZHANG L, ZHANG S, et al. Global analysis of gene expression profiles in physic nut (*Jatropha curcas* L.) seedlings exposed to drought stress [J]. BMC Plant Biology, 2015, 15(1): 1-17.
- [21] ZHANG L, ZHANG C, WU P Z, et al. Global analysis of gene expression profiles in physic nut (*Jatropha curcas* L.) seedlings exposed to salt stress [J]. PLoS ONE, 2014, 9(5): e97878.
- [22] JIANG H W, WU P Z, ZHANG S, et al. Global analysis of gene expression profiles in developing physic nut (*Jatropha curcas* L.) seeds [J]. PLoS ONE, 2012, 7(5): e36522.
- [23] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [24] TAMURA K, PETERSO D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10):2731-2739.
- [25] WU P Z, ZHOU C P, CHENG S, et al. Integrated genome sequence and linkage map of physic nut (*Jatropha curcas* L.), a biodiesel plant [J]. Plant Journal, 2015, 81(5):810-821.
- [26] CANNON S B, MITRA A, BAUMGARTEN A, et al. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana* [J]. BMC Plant Biology, 2004, 4(1):1-10.
- [27] XIONG W D, X X Q, LIN Z, et al. Genome-wide analysis of the WRKY gene family in physic nut (*Jatropha curcas* L.) [J]. Gene, 2013, 524(2):124-132.
- [28] TANG M, LIU X, DENG H, et al. Over-expression of *JcDREB*, a putative AP2/EREBP domain-containing transcription factor gene in woody biodiesel plant *Jatropha curcas*, enhances salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Science, 2011, 181(6):623-631.
- [29] CHENG H L, JIN H P, WANG H Y, et al. Role of *Arabidopsis* RAP2.4 in regulating light-and ethylene-mediated developmental processes and drought stress tolerance [J]. Molecular Plant, 2008, 1(1):42-57.
- [30] HE L, SU C, WANG Y C, et al. ATDOF5.8 protein is the upstream regulator of ANAC069 and is responsive to abiotic stress [J]. Biochimie, 2015, 110:17-24.
- [31] LIU L, WHITE M J, MACRAE T H, et al. Transcription factors and their genes in higher plants [J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 262(2):247-257.
- [32] PI L, AICHINGER E, VAN d G E, et al. Organizer-derived WOX5 signal maintains root columella stem cells through chromatin-mediated repression of CDF4 expression [J]. Developmental Cell, 2015, 33(5):576-588.
- [33] NEGI J, MORIWAKI K, KONISHI M, et al. A Dof transcription factor, SCAP1, is essential for the development of functional stomata in *Arabidopsis* [J]. Current Biology, 2013, 23(6):479-484.

(责任编辑:陈海霞)